

· 药理 ·

双参芎连颗粒对高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠血管舒张及PI3K/Akt/eNOS通路的影响

李磊, 孟红旭, 林力, 金龙, 史跃, 马彦雷, 刘建勋*

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

[摘要] 目的:研究双参芎连颗粒对高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠血管病变及磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路影响。方法:大鼠随机分为5组,分别为假手术组、模型组、双参芎连颗粒高、中、低剂量(8,4,2 g·kg⁻¹)组。采用高蛋白饲料喂养结合5/6肾摘除法建立大鼠高同型半胱氨酸血症慢性肾病模型,5/6肾摘除术后4周后开始连续灌胃给药4周。术后4,8周测定大鼠动脉血压;术后8周实验结束,取血测定血清肌酐、尿素氮、同型半胱氨酸、蛋氨酸及血脂水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胸主动脉磷酸化(p-)p85,p-Akt和p-Ser177等PI3K/Akt/eNOS信号通路相关蛋白表达,测定血清一氧化氮(NO),eNOS;采用离体血管环灌流方法,测定内皮依赖性舒张和非内皮依赖性舒张变化;苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织及胸主动脉血管改变。结果:实验8周时,与假手术组比较,模型组动脉收缩压、血清尿素氮、肌酐、高同型半胱氨酸、蛋氨酸、总胆固醇及低密度脂蛋白明显增高;给予双参芎连颗粒4周后,各剂量组动脉收缩压、血清尿素氮、高同型半胱氨酸、蛋氨酸、血清总胆固醇及血清低密度脂蛋白均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),双参芎连颗粒8,4 g·kg⁻¹组肌酐明显降低($P<0.05$)。双参芎连颗粒各剂量组NO含量较模型组明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),双参芎连颗粒8 g·kg⁻¹组血清eNOS活性较模型组明显升高($P<0.05$)。模型组动物离体胸主动脉环的内皮依赖性及非内皮依赖性血管舒张均受到明显损伤,双参芎连颗粒8 g·kg⁻¹组在乙酰胆碱累积浓度 $1\times 10^{-5.5}\sim 1\times 10^{-4}$ mmol·L⁻¹舒张程度较模型组明显改善($P<0.05$, $P<0.01$);双参芎连颗粒8 g·kg⁻¹组血管环在硝普钠浓度 $1\times 10^{-10}\sim 1\times 10^{-7}$ mmol·L⁻¹舒张程度较模型组明显,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。Western blot结果显示,与假手术组比较,模型组血管p-85,p-Akt及p-Ser177的表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,双参芎连颗粒各剂量组该通路磷酸化水平较模型组呈升高趋势,其中双参芎连颗粒8 g·kg⁻¹组p-Akt及p-Ser177的表达升高更明显,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。双参芎连颗粒各剂量组的胸主动脉和肾脏组织病理变化与模型组比较有不同程度的减轻。结论:双参芎连颗粒可以改善高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠高同型半胱氨酸及血脂代谢异常,降低血清肌酐及尿素氮水平,降低动脉收缩压,改善血管形态及舒张功能,其作用可能与调控PI3K/Akt/eNOS信号通路有关。

[关键词] 双参芎连颗粒; 高同型半胱氨酸; 慢性肾病; 血管病变; 磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/一氧化氮合酶(eNOS)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)01-0088-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202007

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200807.0847.002.html>

[网络出版日期] 2020-8-7 08:55

Effect of Shuangshen Xionglian Granule on Vasodilation and PI3K/Akt/eNOS Pathway in Hyperhomocysteinemia Chronic Kidney Disease Rats

LI Lei, MENG Hong-xu, LIN Li, JIN Long, SHI Yue, MA Yan-lei, LIU Jian-xun*

(Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[收稿日期] 20200529(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603335);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301018)

[第一作者] 李磊,博士,副研究员,从事中药心血管药理研究,Tel:010-62835608,E-mail:lilei0502@126.com

[通信作者] *刘建勋,博士,研究员,从事中药心血管药理研究,Tel:010-62835601,E-mail:liujx0324@sina.com

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Shuangshen Xionglian (SSXL) granules on vasculopathy and phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/serine threonine kinase (Akt)/nitrogen oxide synthase (eNOS) signal in hyperhomocysteinemia chronic kidney disease rats. **Method:** Rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, model group, and high, medium and low-dose (8, 4, 2 g·kg⁻¹) SSXL groups. The model of hyperhomocysteinemia chronic kidney disease in rats was established with high methionine feed combined with 5/6 nephrectomy. After 5/6 nephrectomy, continuous intragastric administration lasted for four weeks. Arterial blood pressure was measured at the 4th and 8th weeks after operation. At the end of the 8th week after the operation, blood was collected to determine serum creatinine, urea nitrogen, homocysteine (Hcy), methionine and blood lipid. Western blot was used to detect the expressions of PI3K/Akt/eNOS pathway-related proteins, such as p-p85, p-Akt and p-Ser177 in thoracic aorta, and serum NO and eNOS were measured. The changes of endothelium-dependent relaxation and non-endothelium-dependent relaxation were measured by the method of isolated thoracic aorta ring. Pathological htoxylin eosin (HE) staining was used to observe the changes of renal tissue and thoracic aorta. **Result:** At the 8th week of the experiment, compared with the sham operation group, arterial systolic blood pressure, serum urea nitrogen, creatinine, Hcy, methionine, total cholesterol and low-density lipoprotein of the model group were significantly increased. Four weeks later after administration, arterial systolic blood pressure, serum urea nitrogen, Hcy, methionine, serum total cholesterol and serum low-density lipoprotein were significantly reduced in each dose group ($P<0.05$, $P<0.01$). The creatinine in the SSXL 8, 4 g·kg⁻¹ group was significantly reduced ($P<0.05$). The nitric oxide content of SSXL in each dose groups were increased compared with that in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the serum eNOS activity of the SSXL in the SSXL 8 g·kg⁻¹ group was significantly increased compared with that in the model group ($P<0.05$). The endothelium dependent and non-endothelium dependent vasodilation of thoracic aortic rings in the model group were significantly damaged. The cumulative concentration of acetylcholine ($1\times 10^{-5.5}\sim 1\times 10^{-4}$ mmol·L⁻¹) in the SSXL 8 g·kg⁻¹ group was significantly improved ($P<0.05$, $P<0.01$). The diastolic degree of the vascular ring in the SSXL 8 g·kg⁻¹ group was significantly higher than that in the model group ($P<0.05$). Western blot results showed that the expressions of p-85, p-Akt and p-Ser177 in blood vessels increased in the sham group compared with those in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the phosphorylation level of this pathway was increased in the SSXL groups, and the expressions of p-Akt and p-Ser177 in the SSXL 8 g·kg⁻¹ group were significantly increased ($P<0.05$). The pathological results showed that the pathological changes of thoracic aorta and renal tissue in the dosages of SSXL were significantly reduced compared with those in the model group. **Conclusion:** SSXL granules can improve hyperhomocysteine and dyslipidemia in rats of chronic kidney disease with hyperhomocysteine, reduce serum creatinine, urea nitrogen levels and arterial systolic blood pressure, and improve vascular morphology and diastolic function, which may be related to the regulation of the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway.

[Key words] Shuangshen Xionglan granule; hyperhomocysteine; chronic kidney disease; vascular disease; phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/serine threonine kinase (Akt)/nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathway

慢性肾病是全球性的健康问题,由慢性肾病所引起的终末期肾病在全世界的发病率逐年提高。终末期肾病患者中心血管疾病死亡率是年龄、种族及性别匹配正常人群的10~20倍,占终末期肾病死亡率的30%~50%^[1]。高同型半胱氨酸(Hcy)是近年来发现的心血管疾病发病的独立危险因子。高Hcy血症常并发于慢性肾病,根据慢性肾病程度不同

36%~89%的患者可见血清高Hcy升高,85%~100%的终末期肾病可见高Hcy血症^[3]。前瞻性临床研究显示血清Hcy升高5 μmol·L⁻¹就会增加终末期肾病患者7%的死亡率和9%的心血管事件概率,Hcy水平可能是终末期肾病的心血管疾病和死亡率的一个危险因子^[4]。慢性肾病患者Hcy水平和心血管事件虽然存在直接关联性,然而临床研究显示降低血

清Hcy水平(给予叶酸或维生素)并未使慢性肾病患者在心血管方面得到受益^[5]。Hcy在慢性肾病患者的心血管病变的具体机制仍不清楚。因此,深入研究Hcy在慢性肾病的血管功能形态改变机制,确立血管病变治疗靶点,寻求新的干预策略对于提高慢性肾病患者生存质量、减轻患者经济压力及政府卫生支出有着深远的意义。

血管内皮受损是微血管和大血管病变的重要因素,肾衰竭早期即可见内皮功能异常,提示内皮功能损伤是导致慢性肾病过程中心血管事件发生的始动环节。一氧化氮(NO)信号通路的改变被认为是慢性肾病血管功能异常的重要原因。一氧化氮作为重要的内皮调节因子,其保护效应主要是通过调节血管张力和血压,抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移,抑制血小板聚集,抑制单核细胞和血小板的黏附等作用来实现的。一氧化氮由L-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)作用下生成。磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路广泛存在细胞中,是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路。近年来研究显示PI3K/Akt/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)通路在高Hcy血症导致内皮功能异常中起到重要作用^[6-7],PI3K/Akt/eNOS通路在肾病过程的保护作用也有报道^[8],然而慢性肾病高Hcy血症时PI3K/Akt/eNOS通路变化鲜见报道。

双参芎连颗粒(曾称痰瘀同治方、祛瘀化痰通脉颗粒)是本研究室自主研发的中药复方新药,由丹参、川芎、人参、山楂、黄连、泽泻、红曲7味中药的有效部位组合而成,其功效为祛瘀化痰、解毒通脉、行气止痛,主要用于痰瘀互结证冠心病及动脉粥样硬化等治疗,目前该药物已获得新药临床批件(2017L05239)。前期研究结果显示,对高脂加高蛋白氨基酸喂养,复合颈总动脉球囊拉伤术造模的大鼠动脉粥样硬化模型,双参芎连颗粒可显著降低血清Hcy水平,具有稳定动脉粥样硬化易损斑块的作用;中国小型猪痰瘀互结证冠心病的病症结合方证相应研究显示,双参芎连颗粒能够改善痰瘀互结证冠心病小型猪血液流变学的异常状态,同时具有调节血脂的作用,同时该方可改善比格犬心脏血流动力学指标,提高心脏泵血功能,增加冠脉血流量,同时还可以降低心肌耗氧量^[9-13]。

本实验在前期建立的大鼠高Hcy血症慢性肾病模型基础上,观察双参芎连颗粒对其血管收缩舒张功能及血管形态学等改变,同时观察胸主动脉PI3K/Akt/eNOS通路的改变,为临床应用及进一步

的机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠50只,体质量(200±10)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-002。动物饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级实验动物中心,温度20~25℃,相对湿度40%~70%,明/暗周期为12h/12h,大鼠自由饮水进食。本研究获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准(2018XLC003-2)。

1.2 药物和试剂 实验用双参芎连颗粒提取浸膏粉,由中国中医科学院中药研究所提供,批号20180516;氯化钠,氯化钾,磷酸二氢钾,七水硫酸镁,碳酸氢钠,D-葡萄糖,氯化钙,氯化乙酰胆碱和硝普钠(美国Sigma公司,批号分别为SLBQ5226,SLBR9127,SLBV9774,MK BX8652,SLBR9485,SLBS8727,SLBR2527,BCBR3675V,LRAA9205);血清肌酐(SCr),尿素氮(BUN),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(日本和光纯药工业株式会社,批号分别为701791,709041,70031,71008,70801,70040);L-同型半胱氨酸标准品(美国Sigma公司,批号121M3904V);L-蛋氨酸标准品(中国药品生物制品检定所,批号140684-200401);色谱级乙腈、色谱级甲醇(美国Fisher Chemical公司,批号分别为193502,194253);甲酸(美国ROE SCIENTIFIC公司,批号17M8207);重酒石酸去甲肾上腺素注射液(天津金耀药业有限公司,批号1805101);p-Akt及p-eNOS(Ser1177)抗体(华兴博创生物技术公司,批号分别为HX17797,HX17030);p-p85抗体(英国Abcam公司,批号Ab191606);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司,批号5174);动物饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0010;NO测试盒和NOS测试盒(南京建成生物工程研究所提供,批号分别为20180823,20180829);迈耶氏苏木素染色液和伊红染色液(北京益利精细化学品有限公司,批号分别为20191023,20191214)。

1.3 仪器 MP-150型多导生理记录仪,经DA100C放大器与MP-150型多导生理记录仪连接,数据采集软件采用AcqKonwledge 4.1(美国Biopac公司);JZ101型张力换能器,量程0~10g(北京新航兴业科贸有限公司);CS601型高精度超级恒温水浴系统(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);Milli-Q型超

纯水机(美国默克密理博公司);BP-98A型大鼠无创血压测定仪(日本 Softron 公司);1200型高效液相色谱仪液相,配有 GB79B Degasser, U1312A Bin pump, G1367B Hip-ALS, G1330B FC/ALS Therm 和 G1316A TCC(美国 Agilent 公司);API 4000 QTRAP 质谱系统,配有 ESI 离子源和 Analysis 1.5.1 数据处理系统(美国 Applied Biosystem 公司);Mini-PROTEAN 3 Dodeca 型电泳槽,VE 186 型转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 实验分组 大鼠随机分为5组,每组10只,分为假手术组(正常饲料)、模型组(2% L-蛋氨酸饲料+5/6肾摘除)、双参芎连高、中、低剂量组(8, 4, 2 g·kg⁻¹)。给药剂量根据临床剂量换算,4 g·kg⁻¹为临床等效剂量(双参芎连颗粒中剂量组)。

2.2 造模与给药 动物适应性喂养1周后分两阶段进行5/6肾摘除术^[14]。0.3%戊巴比妥钠溶液,按10 mL·kg⁻¹剂量进行腹腔麻醉,大鼠麻醉后取右侧卧位充分暴露左肾区,局部备皮常规碘伏消毒,取左背侧直切口切开皮肤,在腹膜后取出左肾,剥离周围脂肪及肾包膜。分别剪去左肾上下各1/3左右皮质,应用可吸收性明胶海绵压迫止血,缝合肌层及皮肤。1周后进行第2次手术,同法充分暴露右侧肾脏后,血管钳夹住血管,结扎,摘除右肾,缝合、消毒。每次术后给予青霉素10万单位/只以预防感染。两次手术共摘除双侧肾脏的5/6。假手术组大鼠只分离肾脂肪囊,不切除肾组织。完成5/6肾摘除的大鼠给予高蛋氨酸饲料(2% L-蛋氨酸)喂养,5/6肾摘除后计实验0周,实验共8周,实验4周时各给药组开始给药,连续给药4周,每天灌胃给药1次。假手术组和模型组灌胃等体积生理盐水。

2.3 动脉血压测定 每4周测定一次动脉收缩压和舒张压,采用无创动物血压计,测量清醒状态下大鼠尾动脉血压。测量时先将大鼠置于专用保温桶中38℃预热10 min,待大鼠状态稳定后,连续测量3次,每次间隔2 min,血压数据取3次测量的均值。每次血压测定时间固定于早上8:00~11:00。

2.4 离体血管环测定内皮依赖性舒张和非内皮依赖性舒张 实验结束时,麻醉动物迅速分离胸主动脉,置于克-亨氏液中。克-亨氏液组成(mmol·L⁻¹): NaCl 134.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7 H₂O 1.2, NaH₂CO₃ 16.3, Glucose 7.8, CaCl₂ 2.5, pH 7.4。克-亨氏液保持37℃恒温并通入95%氧气和5%二氧化碳的混合气体。仔细去除血管附着的结缔、脂肪

组织和小分支血管,避免过度使用拉力损伤血管内皮。完全分离后,将胸主动脉切成4~5 mm的血管环。血管环的一端固定支架底端,另一端连接张力换能器,用生理记录仪记录血管张力变化。开始添加1.5 g张力负荷,不断调整张力水平,保持在1.5 g水平,稳定90 min,期间每15 min更换克-亨氏液。血管稳定90 min后,由KCl(40 mmol·L⁻¹)预收缩2次,收缩活性良好的血管环用于后续试验。测定血管环对去甲肾上腺素(NE)1×10⁻⁹~1×10⁻⁵ mol·L⁻¹的收缩反应性。测定内皮依赖性舒张反应,先用NE 1×10⁻⁶ mol·L⁻¹预收缩血管,待血管收缩到达平台后,逐步累加1×10⁻⁹~1×10⁻⁴ mol·L⁻¹的乙酰胆碱(ACh),记录血管张力随浓度变换的数值。测定非内皮依赖性舒张反应,先用NE 1×10⁻⁶ mol·L⁻¹预收缩血管,待血管收缩到达平台后,逐步累加1×10⁻¹¹~1×10⁻⁶ mol·L⁻¹的硝普钠(SNP),记录血管张力随浓度变换的数值。

2.5 测定 SCr, BUN, TC, TG, HDL-C 及 LDL-C 的含量 实验结束,腹主动脉取血,常规制备血清,于-80℃冻存。全自动生化仪测定血清 SCr, BUN, TC, TG, HDL-C 及 LDL-C 含量;采用试剂盒检测血清 NO 和 NOS 含量,严格按照试剂盒说明书步骤进行;采用 LC-MS/MS 测定血清 Hcy 和蛋氨酸含量^[15]。色谱条件为 CAPCELL PAK CR 1:4 色谱柱(150×2.00 mm, 5 μm, Col. No. U16IB 10013),柱温 35℃,进样量为 5 μL,自动进样器 4℃,运行时间 10 min。水相为 10 mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液(0.2% 甲酸),有机相为甲醇乙腈等比液(0.2% 甲酸和 10 mmol·L⁻¹甲酸铵),流速 0.30 mL·min⁻¹,梯度洗脱。质谱条件为离子源为 ESI 源,气帘气体 10 p.s.i.,源内温度 5 500℃,源内气体 GS1 为 50 p.s.i.,源内气体 GS2 为 40 p.s.i.,离子喷射电压(IS) 5 500 V,碰撞气(CAD)High, TEM 600℃,检测方式正离子检测,扫描方式选择反应监测(MRM)方式。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠胸主动脉组织中磷酸化的 p-p85, p-Akt 及 p-eNOS (Ser1177)蛋白水平 取主动脉组织 100 mg 经过匀浆、裂解、超声破碎、高速离心(13 000 r·min⁻¹离心 20 min, 4℃)后,取上清液,采用 BCA 试剂盒在酶标仪上测定蛋白浓度。再取上述总蛋白提取液 50 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,37℃封闭 1~2 h,洗膜后分别加入 p-p85 (1:1 000), p-Akt (1:1 000) 及 p-Ser1177 (1:1 000)一抗,4℃慢摇孵育过夜,洗膜后以相应

的二抗(1:1万)37℃孵育1h,加入化学发光检测试剂,进行条带显色后,置于凝胶成像系统中曝光检测。以GAPDH为内参,Image J软件获得灰度值进行统计处理。

2.7 HE染色观察主动脉血管及肾脏组织病理学变化 实验结束时,取主动脉血管及肾脏组织,10%甲醛固定、乙醇脱水、石蜡包埋、切片及HE染色,光镜下进行形态学观察。

2.8 统计学分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,血管舒张百分率为去甲肾上腺素诱导压力最大值与舒张后的比值。半最大效应对应浓度负对数(pEC_{50})值为产生50%舒张效应时的摩尔浓度负对数值,最大舒张效应(E_{max})是指最大舒张效应时的血管舒张率。 pEC_{50} 值和 E_{max} 值由每一条浓度-效应曲线应用

GraphPad Prism 5.0软件非线性拟合计算得出。统计分析采用SPSS 23.0统计软件,重复测量数据(血管舒张)进行球形检验和方差分析;组间差异采用单因素方差分析,当组间有差异时使用Tukey's HSD进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对慢性肾病大鼠血压的影响 模型组与各组动物在实验开始4周时动脉收缩压与舒张压均在同一水平,与假手术组比较均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给予双参芎连颗粒后,各剂量组动物动脉收缩压显著降低,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),各剂量组动物动脉舒张压未见明显差异。见表1。

表1 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠血压的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Shuangshen Xionglian granules (SSXL) on blood pressure in rats with chronic kidney disease ($\bar{x} \pm s, n=10$) mmHg

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	收缩压		舒张压	
		4周	8周	4周	8周
假手术		119.3±6.1	121.8±5.8	91.2±5.4	89.6±8.3
模型		138.3±5.9 ²⁾	156.1±6.1 ²⁾	109.0±8.8 ²⁾	111.7±9.2 ²⁾
双参芎连颗粒	8	136.8±4.3 ²⁾	142.4±6.6 ⁴⁾	107.1±6.8 ²⁾	108.4±7.4 ²⁾
	4	137.5±5.6 ²⁾	142.4±3.7 ⁴⁾	109.7±8.4 ²⁾	107.1±10.4 ²⁾
	2	136.8±10.1 ²⁾	144.2±4.8 ⁴⁾	107.9±5.8 ²⁾	110.6±8.3 ²⁾

注:1 mmHg≈0.133 kPa;与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2~6,图1同)。

3.2 对慢性肾病大鼠SCr, BUN, Hcy及Met含量的影响 与假手术组比较,模型组动物血清BUN, SCr水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给予双参芎连颗粒后,各剂量组血清BUN含量均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),双参芎连颗粒也有降低血清SCr含

量趋势,其中双参芎连颗粒8,4 $g \cdot kg^{-1}$ 组较模型组有统计学差异($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型血清高Hcy和Met含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给予双参芎连颗粒,各剂量组血清高Hcy和Met含量明显降低($P < 0.05$)。见表2。

表2 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠SCr, BUN, Hcy及Met含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of SSXL on creatinine, blood urea nitrogen, homocysteine and methionine in rats with chronic kidney disease ($\bar{x} \pm s, n=10$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	BUN	SCr	Hcy	Met
假手术		4.65±0.40	24.06±2.11	0.89±0.21	12.29±1.59
模型		6.68±1.02 ²⁾	31.34±5.03 ²⁾	10.39±2.68 ²⁾	45.23±15.23 ²⁾
双参芎连颗粒	8	5.86±0.65 ³⁾	27.86±2.14 ³⁾	6.00±3.32 ³⁾	28.56±11.04 ³⁾
	4	5.67±0.51 ⁴⁾	26.82±2.81 ³⁾	5.66±3.36 ³⁾	29.15±16.65 ³⁾
	2	5.78±0.71 ³⁾	28.82±2.60	7.02±2.18 ³⁾	31.12±8.80 ³⁾

3.3 对慢性肾病大鼠血脂, NO水平及eNOS活性的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清TC显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,双参芎连颗粒各剂量组动物血清TC显著降低($P < 0.01$),各给药组的血清LDL-C含量也明显降低($P < 0.05$)。与假手术

组比较模型组动物血清NO含量与eNOS活性未见明显差异;与模型组比较,双参芎连颗粒各剂量组动物血清NO含量显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),双参芎连颗粒8 $g \cdot kg^{-1}$ 组动物血清eNOS活性明显升高($P < 0.05$)。见表3。

表 3 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠血脂, NO 水平及 eNOS 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of SSSL on blood lipids, NO and eNOS in rats with chronic kidney disease ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹	eNOS/U·mL ⁻¹
假手术		1.35±0.15	0.44±0.11	0.80±0.12	0.28±0.04	37.69±3.33	44.12±3.22
模型		1.83±0.23 ²⁾	0.44±0.10	0.93±0.13 ¹⁾	0.33±0.04 ¹⁾	37.66±2.29	44.24±3.76
双参芎连颗粒	8	1.46±0.16 ⁴⁾	0.38±0.13	0.89±0.10	0.25±0.04 ³⁾	44.17±5.56 ⁴⁾	49.15±4.23 ³⁾
	4	1.47±0.25 ⁴⁾	0.38±0.15	0.88±0.12	0.28±0.05 ³⁾	42.85±3.32 ³⁾	45.82±5.02
	2	1.45±0.20 ⁴⁾	0.39±0.11	0.89±0.11	0.27±0.05 ³⁾	40.89±3.64 ³⁾	43.88±4.11

3.4 对慢性肾病大鼠 ACh 及硝普钠的血管舒张作用的影响 与假手术组比较, 模型组动脉血管环对 ACh 舒张性显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 双参芎连颗粒 8 g·kg⁻¹ 组血管环对 ACh 的舒张性显著改善 ($P<0.01$), 在 ACh 累积浓度 $1 \times 10^{-5.5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mmol·L⁻¹ 舒张程度明显改善 ($P<0.05, P<0.01$), 见图 1。各组对 ACh 的半最大效应对应浓度负对数 (pEC_{50}) 未见明显差异。与假手术组比较, 模型组对 ACh 的最大舒张效应 (E_{max}) 显著降低 ($P<0.01$), 双参芎连颗粒 8, 4 g·kg⁻¹ E_{max} 较模型组明显升高 ($P<$

0.05)。见表 5。

与假手术组比较, 模型组动脉血管环对 SNP 舒张性明显降低 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较, 8 g·kg⁻¹ 组在 SNP 累积浓度 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-7}$ mmol·L⁻¹ 时舒张程度明显改善 ($P<0.05$), 参芎连颗粒 4 g·kg⁻¹ 组在 SNP 累积浓度 1×10^{-8} mmol·L⁻¹ 时舒张程度明显改善 ($P<0.05$)。见图 1。与假手术组比较, 模型组对 SNP 的 pEC_{50} 显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 双参芎连颗粒 8 g·kg⁻¹ 组 pEC_{50} 明显升高 ($P<0.05$)。各组对 SNP 的 E_{max} 未见明显差异。见表 5。

表 5 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠 ACh 和 SNP 诱导血管舒张的 pEC_{50} 和 E_{max} ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of SSSL on pEC_{50} and E_{max} values of relaxation responses to acetylcholine and sodium nitroprusside in aortic rings precontracted by norepinephrine in rats with chronic kidney disease ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACh		SNP	
		pEC_{50}	$E_{max}/\%$	pEC_{50}	$E_{max}/\%$
假手术		7.04±0.40	99.00±2.24	6.59±0.26	119.21±8.90
模型		6.81±0.46	59.61±10.84 ²⁾	5.45±0.53 ²⁾	117.37±12.94
双参芎连颗粒	8	6.81±0.43	76.57±20.22 ³⁾	5.87±0.49 ³⁾	126.51±12.32
	4	6.78±0.58	72.11±16.59 ³⁾	5.75±0.48	122.37±16.67
	2	6.69±0.51	67.31±20.66	5.85±0.56	118.09±30.40

3.5 对慢性肾病大鼠胸主动脉 PI3K/Akt/eNOS 通路的影响 与假手术组比较, 模型组血管组织 PI3K/Akt/eNOS 信号通路磷酸化水平呈升高趋势, p-85, p-Akt 及 p-Ser177 的表达均显著升高 ($P<$

0.01); 与模型组比较, 双参芎连颗粒各剂量组信号通路磷酸化水平呈升高趋势, 其中 8 g·kg⁻¹ 组 p-Akt 及 p-Ser177 的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 6 和图 2。

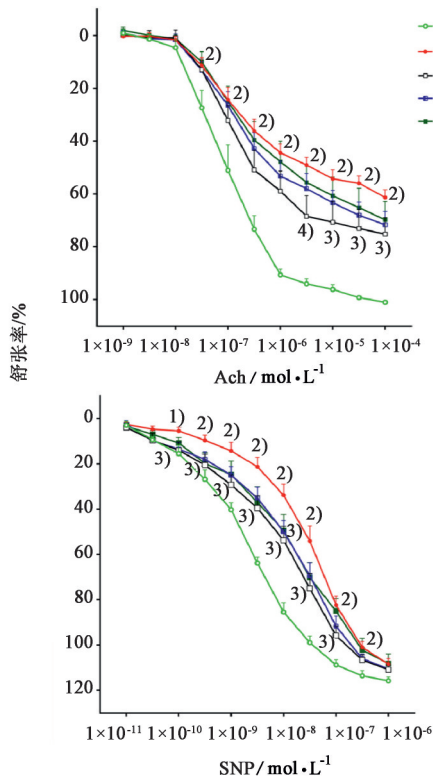
表 6 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠胸主动脉 p-85, p-Akt 及 p-Ser177 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of SSSL on expression of p-85, p-Akt and p-Ser177 protein in rat thoracic aorta with chronic kidney disease ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-85/GAPDH	p-Ak/GAPDH	p-Ser177/GAPDH
假手术		0.164±0.062	0.225±0.052	0.176±0.017
模型		0.320±0.131 ²⁾	0.403±0.080 ²⁾	0.386±0.037 ²⁾
双参芎连颗粒	8	0.447±0.119	0.559±0.047 ³⁾	0.520±0.056 ³⁾
	4	0.393±0.113	0.457±0.065	0.463±0.157
	2	0.413±0.063	0.395±0.073	0.367±0.072

3.6 对慢性肾病大鼠血管病理形态学影响 假手术组主动脉血管壁完整, 内膜、中膜及外膜 3 层结构

清楚、界限明显。模型组血管壁完整, 内膜内皮细胞轻度肿胀, 中膜增厚, 平滑肌组织增生、肥大, 外



A. 假手术组; B. 模型组; C. 双参芎连颗粒 $8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 双参芎连颗粒 $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 双参芎连颗粒 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图2~4同)
图1 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠Ach和硝普钠诱导血管舒张率的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Fig. 1 Effect of SSSL on dose-response curves for relaxation responses induced by acetylcholine and sodium nitroprusside in aortic rings precontracted by norepinephrine ($\bar{x}\pm s, n=10$)

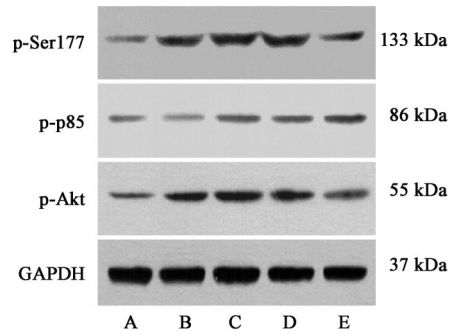


图2 大鼠主动脉p-p85, p-Akt及p-Ser177蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of p-p85, p-Akt and p-Ser177 protein expression in rat aorta

膜层小血管增生,轻度水肿。双参芎连颗粒 $8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组较模型组血管病变程度低,血管壁完整,内膜内皮细胞未见明显变性,中膜增厚不明显,平滑肌组织轻度增生。见图3。

3.7 对慢性肾病大鼠肾脏病理形态学影响 假手术组动物肾小球结构正常,血管球清晰,充盈良好,球囊腔未见扩张或萎缩。模型组肾小球呈萎缩病变,血管球变小,管腔闭塞,小灶可呈代偿性扩张,球囊腔变窄,系膜基质与系膜细胞增生,基底膜增厚明显;肾小管排列紊乱,肾小管上皮细胞空泡样变性,间质充血水肿,大量炎细胞浸润,明显纤维组织增生。双参芎连颗粒各剂量组动物较模型组动物肾小球萎缩程度减轻,局部可呈代偿性扩张,球囊腔轻度变窄。见图4。

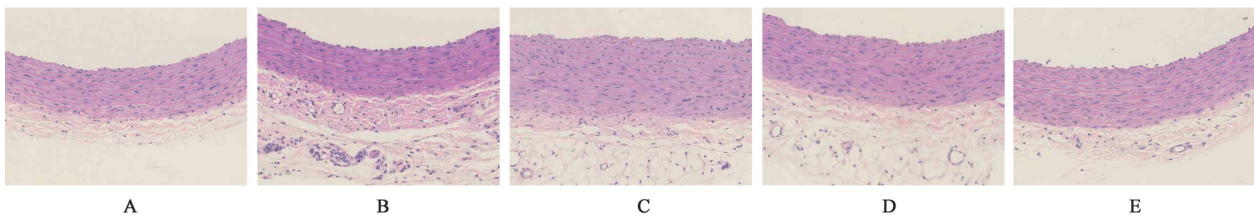


图3 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠主动脉病理变化的影响(HE, ×200)
Fig. 3 Effect of SSSL on aorta pathology changes in rats with chronic kidney disease(HE, ×200)

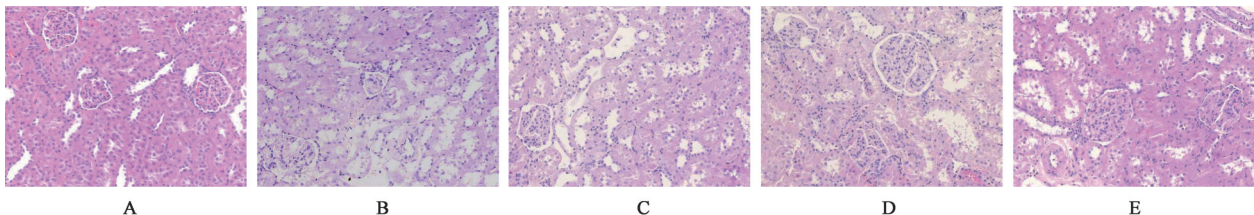


图4 双参芎连颗粒对慢性肾病大鼠肾脏病理变化的影响(HE, ×200)
Fig. 4 Effect of SSSL on kidney pathology changes in rats with chronic kidney disease(HE, ×200)

4 讨论

慢性肾脏患者肾功能受损程度与血浆Hcy水平增高程度相一致,常规检测慢性肾病患者的血浆

Hcy水平,可预防或延缓发生心脑血管事件^[16]。叶酸、维生素B₆和B₁₂是Hcy在体内代谢的重要辅酶,单独补充叶酸或联用维生素B₆和B₁₂均能显著降低

血液中Hcy的浓度水平。然而补充叶酸、维生素B₆和B₁₂控制Hcy水平对于慢性肾病过程中的心血管事件发生的作用存在争议。HOST研究纳入的研究对象为晚期慢性肾脏疾病或终末期肾脏病患者,且伴有高半胱氨酸水平。参与者每天服用含有叶酸、维生素B₆和B₁₂的胶囊或安慰剂。结果发现,维生素B组Hcy水平明显降低,但患者生存率和心血管疾病发生率并没有明显降低^[17]。一项大型随机试验研究结果显示,与单独使用依那普利相比,依那普利+叶酸组患者慢性肾病进展风险降低了21%,高血压患者eGFR下降风险降低了13%,并显著降低了联合终点(肾脏病变发展和死亡)的风险,该研究最后也指出补充叶酸的好处可能只适用于Hcy代谢基因缺陷或膳食叶酸摄入量不足的人群^[18]。慢性肾病高Hcy血症的血管病变发病机制及治疗方案仍然探索中。

5/6肾切除大鼠模型是一种经典的慢性肾病动物模型,广泛应用于慢性肾病发病与药物作用机制研究,近来研究者将该模型开展了与心血管相关疾病的研究^[19-22]。本课题组前期通过给予大鼠高Met饲料结合5/6肾摘除的方法,发现高Met饲料结合5/6肾摘除的大鼠模型除了血浆高Hcy及Met升高外,还表现出明显的血脂代谢异常;高Met饲料所导致的高Hcy血症加速了慢性肾病大鼠的血压升高、同时加重了对内皮依赖及非内皮依赖的血管舒张的损伤;然而,模型大鼠胸主动脉NO含量以及血浆eNOS与假手术组大鼠并没有发现明显差异,提示该模型中的eNOS/NO通路并没有出现显著差异,eNOS上游的调控变化与血管收缩功能的关系有待研究^[14]。

慢性肾病属于中医“水肿”“虚劳”“腰痛”等病证范畴,主要病机为因先天禀赋不足或劳倦太甚、饮食起居不节、情志不遂,病后体衰等损伤人体正气引起肺、脾、肾虚损,气血阴阳不足所致^[23]。邪气入侵为发病必要条件,主要为外感六淫、戾气之邪及肾毒药物。慢性肾衰早期肾虚不能制水,则水不归源。此期患者可无明显症状,或仅表现为乏力、腰酸、面色少华、动则乏力加重等不适、舌淡苔薄等气虚无力推动表现,本阶段由于机体正气尚存,肾功能基本能代偿,无明显严重并发症。病情进一步发展,正气已虚,气虚推动无力,痰浊内生,久而成瘀。痰和瘀血进一步相互生成和演化,且痰瘀日久亦可化生毒,尿毒不能排除体外聚积体内。现代中医认为痰浊邪毒与高脂血症、高Hcy血症等密切相

关。近年来,研究者们通过分析临床与实验研究结果,同时结合中医理论,提出气虚血瘀,痰浊邪毒是慢性肾病的主要病机,活血化瘀,化痰解毒则是慢性肾病的重要治则^[24-25]。

本研究通过给予高Met饲料喂养结合5/6肾摘除建立慢性肾病高Hcy血症大鼠模型,研究了祛瘀化痰、解毒通脉功效中药双参芎连颗粒的干预作用。本研究显示,模型动物具有典型的慢性肾病肾脏组织形态学变化,血清SCr和BUN水平明显升高,同时伴随高脂血症、高Hcy血症等改变。给予双参芎连颗粒干预后,大鼠血清Hcy,TC,LDL-C,BUN及CRE水平均明显降低,同时具有明显的改善模型动物血压的作用。离体大鼠胸主动脉模型是血管舒缩活性研究中最常用的一种,主要的观察指标是血管张力,模型动物内皮依赖性或非依赖性舒张均受到明显的损伤。给予双参芎连颗粒干预后,对内皮依赖性血管舒张的E_{max}明显增加,对非内皮依赖的血管性舒张的pEC₅₀明显降低,说明双参芎连颗粒对于血管的舒张功能具有一定的改善作用,这与动物血压改善是对应的。

血管舒缩功能与血压的调节NO密切相关,NO由L-精氨酸在eNOS作用下生成。eNOS的磷酸化可发生于丝氨酸(serine),苏氨酸(threonine)和酪氨酸(tyrosine)等位点,其中Ser1177的磷酸活化上调eNOS的酶活性,而Thr495和Tyr653磷酸化则下调eNOS的活性。PI3K/Akt通路广泛存在细胞中,是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路,近年来研究显示PI3K/Akt/eNOS通路在肾脏病变及高血压血管损伤中起到重要作用^[26-29]。本研究中模型动物的血浆NO含量和血管组织eNOS活性与假手术比较未见明显差异,这与之前的研究结果基本一致^[14]。然而,血管组织的p-Ser1177的Western blot结果表明模型组eNOS表达处于上调状态。以上研究结果提示,慢性肾病高Hcy血症是一种复杂的疾病,存在着慢性的血管病变,动物机体在发病的过程中可能代偿性地促进了血管eNOS的表达进而促进血液循环状态稳定。然而作为机体的代偿的能力是有一定限度的,并不能进一步的平衡慢性肾病和高Hcy血症所造成的损伤。当给模型动物给予双参芎连颗粒干预后,动物的主动脉血管组织的PI3K/Akt/eNOS信号通路表达明显上调,双参芎连颗粒可以明显的降低模型动物血压的上升,改善内皮依赖和非内皮依赖性血管舒张作用,增加血清NO含量和eNOS活性,对血管形态也有一定的

改善。

本研究尚存在一些不足之处,5/6肾摘除复合高Met饲料喂养模型为本课题组首次建立报道的^[14],尚无关于此模型的阳性药物研究报道,由于慢性肾病高Hcy血症的血管病也没有公认的治疗方案,因此本研究中没有使用阳性药物组;另外本研究仅是初步观察了PI3K/Akt/eNOS信号通路表达的变化及血管舒张功能改变,并未使用该通路相应的阻滞剂和激动剂,在后期的研究中将开展相关研究。

综上所述,祛瘀化痰解毒法中药复方双参芎连颗粒可以明显改善慢性肾病高Hcy血症血清Scr, BUN水平,降低血清Hcy及Met含量,降低血清TC及LDL-C含量,调节血压异常,改善血管内皮依赖性和非内皮依赖性血管舒张,其作用可能与上调PI3K/Akt/eNOS信号通路表达有一定关系,本实验为双参芎连颗粒进一步的临床及作用机制研究提供了参考。

[参考文献]

[1] BAZYLUK A, MALYSZKO J, ZBROCH E. Cardiovascular risk in chronic kidney disease: what is new in the pathogenesis and treatment? [J]. *Postgrad Med*, 2018, 130(5):461-469.

[2] JARDINE M J, KANG A, ZOUNGAS S, et al. The effect of folic acid based homocysteine lowering on cardiovascular events in people with kidney disease: systematic review and Meta-analysis [J]. *BMJ*, 2012, 344:e3533.

[3] OSTRAKHOVITCH E A, TABIBZADEH S. Homocysteine in chronic kidney disease [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 72:77-106.

[4] WU C C, ZHENG C M, LIN Y F, et al. Role of homocysteine in end-stage renal disease [J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(16/17):1286-1294.

[5] NIGWEKAR S U, KANG A, ZOUNGAS S, et al. Interventions for lowering plasma homocysteine levels in dialysis patients [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, doi:10.1002/14651858.CD004683.pub4.

[6] LIU S, SUN Z, CHU P, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(5):672-680.

[7] SONG C L, LIU B, SHI Y F, et al. MicroRNA-130a alleviates human coronary artery endothelial cell injury

and inflammatory responses by targeting PTEN via activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44):71922-71936.

[8] ZHU J, CHEN X, WANG H, et al. Catalpol protects mice against renal ischemia/reperfusion injury via suppressing PI3K/Akt-eNOS signaling and inflammation [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2):2038-2044.

[9] 李磊, 刘建勋, 任建勋, 等. 祛瘀化痰通脉颗粒对比格犬心脏血流动力学及心肌耗氧量的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9):90-98.

[10] 林成仁, 李磊, 任建勋, 等. 痰瘀同治方对小型猪痰瘀互结证冠心病血液流变性及血脂的改善作用 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(2):300-303.

[11] 李磊, 刘建勋, 李欣志, 等. 痰瘀同治方对兔动脉粥样硬化对氧磷酶活性及炎症因子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(8):53-56.

[12] 李磊, 林成仁, 任建勋, 等. 痰瘀同治方对痰瘀互结证冠心病小型猪心功能的改善作用 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(3):483-487.

[13] 王建辉, 李磊, 柳芳, 等. 痰瘀同治方对大鼠颈总动脉粥样硬化易损斑块稳定性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20):136-139.

[14] LI L, HASEGAWA H, INABA N, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia impairs vasodilation in 5/6-nephrectomized rats [J]. *Amino Acids*, 2018, 50(10):1485-1494.

[15] YUAN L, SHARER J D. Quantitative Analysis of Total Plasma Homocysteine by LC-MS/MS [J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2016, doi:10.1002/0471142905.hg1721s89.

[16] 蒙如庆, 温海滨, 覃勋. 慢性肾病患者高同型半胱氨酸血症与肾病分期关系研究 [J]. *临床军医杂志*, 2017, 45(3):281-283.

[17] REX L J, PAMELA H, JAMES S K, et al. Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease [J]. *Jama*, 2007, 298(10):1163-1170.

[18] XU X, QIN X, LI Y, et al. Efficacy of folic acid therapy on the progression of chronic kidney disease: the renal substudy of the china stroke primary prevention trial [J]. *JAMA Intern Med*, 2016, 176(10):1443-1450.

[19] ČERTÍKOVÁ CHÁBOVÁ V, KUJAL P, VAŇOURKOVÁ Z, et al. Addition of endothelin a-receptor blockade spoils the beneficial effect of combined renin-angiotensin and soluble epoxide

- hydrolase inhibition: studies on the course of chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized ren-2 transgenic hypertensive rats[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2019, 44(6):1493-1505.
- [20] DE BRAGANÇA A C, CANALE D, GONÇALVES J G, et al. Vitamin D deficiency aggravates the renal features of moderate chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized rats[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5:282.
- [21] BARAKA A, EL GHOTNY S. Cardioprotective effect of renalase in 5/6 nephrectomized rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012, 17(4):412-416.
- [22] 程小红,毛加荣,赵亚峰,等. 肾复康Ⅱ号对5/6肾切除大鼠肾功能及TGF- β_1 /Smads信号通路的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2018, 40(12):1165.
- [23] 孟元,高彦彬,王雨,等. 高彦彬教授从络病论治慢性尿酸性肾病经验[J]. *世界中医药*, 2020, 15(16):2470-2473, 2477.
- [24] 曾琨,王茂泓,晏子友. 慢性肾脏病之“浊邪”探讨[J]. *河南中医*, 2015, 35(3):469-471.
- [25] 谢圣芳,姚源璋,方立明. 慢性肾脏病中西医结合诊治规律新探[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2015, 13(15):4-5.
- [26] 尹超,徐俞悦,陈国杨,等. 铁皮石斛复方对“饮食不节”致高血压大鼠的药效及PI3K/Akt/eNOS信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(11):2345-2351.
- [27] ARAB H H, SALAMA S A, MAGHRABI I A. Camel milk attenuates methotrexate-induced kidney injury via activation of PI3K/Akt/eNOS signaling and intervention with oxidative aberrations [J]. *Food Funct*, 2018, 9(5):2661-2672.
- [28] LI X, LI J, LI Z, et al. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* prevents vascular dysfunction through PI3K/Akt/eNOS-dependent mechanisms in the l-NAME-induced hypertensive rat model [J]. *Food Funct*, 2016, 7(5):2398-2408.
- [29] 刘耀萌,刘钧天,黄畅,等. 不同艾灸因素对阿尔茨海默小鼠PI3K/Akt通路与皮质 β 淀粉样蛋白沉淀的影响[J]. *世界中医药*, 2016, 11(8):1395-1400.

[责任编辑 周冰冰]